

Title	細胞死過程の細胞形態および表面微細構造のナノスケール観察
Author(s)	辻, 明宏
Citation	令和元（2019）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書
Issue Date	2020-06
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/76005
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

2019年度大阪大学未来基金【住野勇財団】学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな氏名	つじ あきひろ 辻 明宏	学部 学科	基礎工学部 電 子物理科学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	山下 隼人	所属	基礎工学研究科		
研究課題名	細胞死過程の細胞形態および表面微細構造のナノスケール観察				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

・研究目的

自発的細胞死は多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症などの難病のきっかけとなり、盛んに研究が行われている。最近では、Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein(MLKL)というタンパク質が、図 1 のように細胞脂質膜中にイオンチャンネルを形成することで自発的細胞死が進行するという分子機構が提唱されている[1]。しかしながら、このイオンチャンネルのナノスケール観察はまだ行われておらず、細胞膜中でのイオンチャンネルの局在や動態、ナノスケール構造は不明である。一方で高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)は生体分子のナノスケールイメージングが可能である[2]。そこで本研究は、このイオンチャンネルを高速原子間力顕微鏡で観察することで、イオンチャンネルの開口を定量的に解析し、自発的細胞死の機構を詳しく解明することを目的としている。

・研究計画と方法

本研究の目的を達成するため以下の手順で研究を進める。

【1】 AFM ガラスステージ上における細胞培養

高速 AFM で生体試料を観察するためには、高速 AFM 専用の、直径 1.5 mm の AFM ガラスステージ(以下、ステージ)上に試料を置く必要がある。そこで死細胞の高速 AFM 観察を行うために、図 2 のように細胞をステージ上にて直接培養する。ステージには Poly-L-Lysine(PL)コーティングを施し、細胞をステージ表面に接着・安定させる。さらに、細胞が状態よく、均一に伸展するための PL と細胞溶液の条件検討を行う。

【2】 光学・蛍光顕微鏡下での細胞死過程の観察

図 1：死細胞表面における MLKL イオンチャンネルの形成

図 2：ステージ上での細胞培養

実際の細胞の細胞死の条件を検討するためシャーレ上で動物細胞(Hela 細胞)を培養する。細胞死誘導試薬として、アポトーシスでは Staurosporine(STP)、ネクローシス(試薬で誘導される場合、厳密にはネクロトーシスと呼ばれる)では TNF α と zVAD を培養細胞に投与し、蛍光標識 FITC を付けた Annexin V(Annexin V:FITC)と Propidium Iodide(PI)を用いて蛍光顕微鏡下で培養細胞を観察することにより、状態変化や経過観察を行う。これにより、試薬濃度や時間スケールなどの条件を確立する。

【3】 AFM による細胞死過程の観察(計測)

上記で得られた条件をもとに AFM 観察を行う。細胞を観察中に Annexin V を投与し、細胞表面の構造をナノスケールで可視化する。また各細胞死誘導試薬を投与し、細胞表面の構造変化を観察する。Annexin V を手掛かりとして、生・死細胞の構造比較を行うと共に、死細胞表面の構造を詳細に解析する。また、細胞の弾性特性の比較なども行うことで、死細胞表面のナノスケールでの構造的特徴や物理的特性を明らかにする。

・研究経過

【1】 ステージ上における細胞培養

ステージを 2 μ L の PL でコーティングした後、50 μ L の細胞溶液を投与し培養を試みたところ、全ての細胞が球状のまま乗っていたり、ステージの淵で PL が捲れあがったりしていた(図 3(a)・(b))ので、PL の量と細胞溶液の濃度条件を検討した。ステ

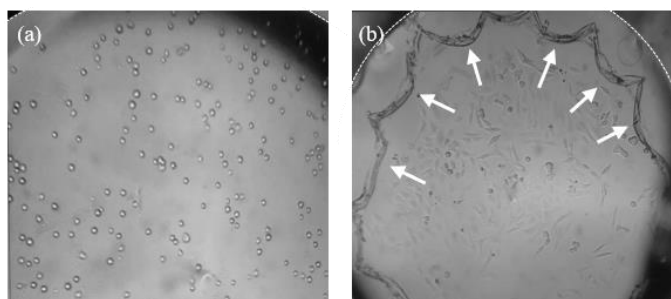


図 3：ステージ上での細胞培養の失敗 (a)球状の細胞 (b)PL の捲れ上がり(矢印)。破線はステージの淵を示す。

ージに投与する PL の量を 0.7 μ L に減らしたところ、PL の捲れ上がりはなくなった。また、一度に投与する細胞溶液の量が多いと、細胞はステージの周りへと拡散していった。そこで細胞溶液を高濃度(初期の 8 倍程度)にした上で、投与量を 5 μ L に減らし、ステージに垂らす液滴の大きさを小さくしたところ、多数の細胞をステージ上に留め、良好な状態で均一に伸展させることに成功した(図 4)。

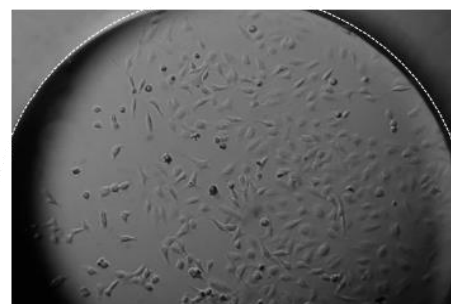


図 4：ステージ上の細胞培養の成功。破線はステージの淵を示す。

【2】 光学・蛍光顕微鏡下での細胞死過程の観察

まず、細胞死が誘導され、蛍光顕微鏡下で検出できることを確認するための実験を行った。35 mm Dish 内にて Hela 細胞を培養し、STP(終濃度 1 μ M)を投与したのち、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし経過観察を行った。STP 投与直後、1 時間後、2 時間後における細胞の様子を図 5 に示す。時間が経過するにつれ細胞の伸展がほどけ、丸まっていく変化が伺えた。続いて細胞を蛍光溶液(5 μ L Annexin V:FITC(FITC), 195 μ L Binding Buffer)に浸し、蛍光顕微鏡下で観察を行った(図 6)。結果として、細胞の FITC による蛍光を観察でき、アポトーシス誘導がなされたことを確認できた。

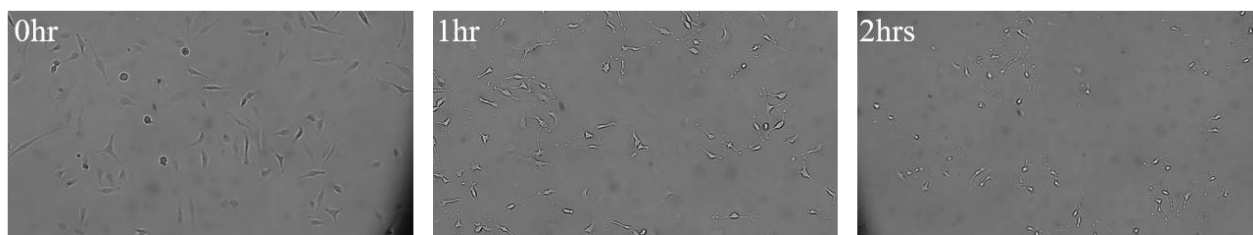


図 5：Hela 細胞死誘導の光学顕微鏡観察(観察時の溶液：2 mL DMEM, 1 μ M STP)

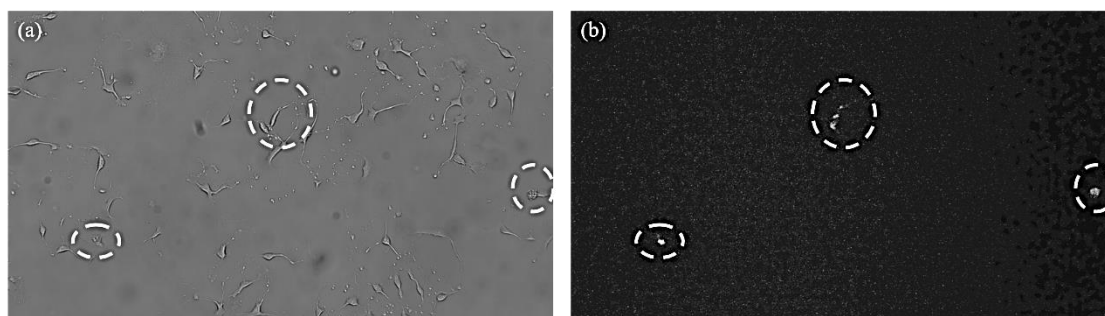


図 6 : HeLa 細胞死誘導(STP 処理より 2 時間)の蛍光顕微鏡観察 (a)明視野像 (b)FITC 蛍光像。図中白丸は(a)(b)で対応している。(観察時の溶液 : 5 μ L Annexin V:FITC(FITC), 195 μ L Binding Buffer)

次に、細胞に STP を投与して 1.5 時間インキュベートし、細胞を Annexin V:FITC と PI で処理(5 μ L FITC, 10 μ L PI, 185 μ L Binding Buffer)したのち、蛍光観察を行った。結果を図 7 に示す。

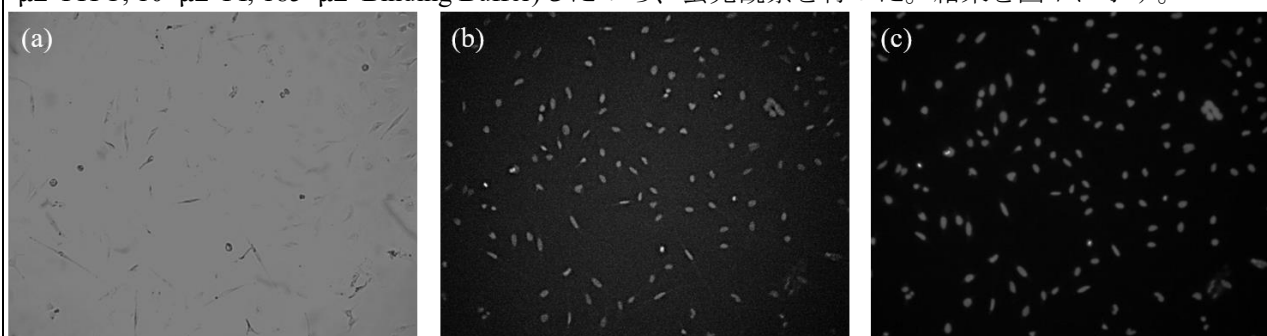


図 7: HeLa 細胞死誘導(STP 処理より 1.5 時間)の蛍光顕微鏡観察 (a)明視野像 (b)FITC 蛍光像 (c)PI 蛍光像。同箇所 of 細胞の観察。(観察時の溶液 : 5 μ L FITC, 10 μ L PI, 185 μ L Binding Buffer)

ここで、FITC と PI の染色原理を図 8 に示す。初期アポトーシスにおいて露出した Phosphatidylserine(PS)と Annexin V:FITC が結合し、FITC による緑色の蛍光を示す。一方、PI は後期アポトーシスまたはネクローシスにおいて細胞膜を透過し核と結合し、赤色の蛍光を示す。両者の蛍光標識による細胞の染色・蛍光を比較することで、初期・後期アポトーシス/ネクローシスを識別できる。図 7 中の細胞は FITC と PI の両方に染色されているため、後期アポトーシスにあることがわかる。このセルカルチャーにおいて FITC のみで染色された細胞は確認されず、ほぼすべての細胞が後期アポトーシス、或いはネクローシスの状態にあったと考えられる。

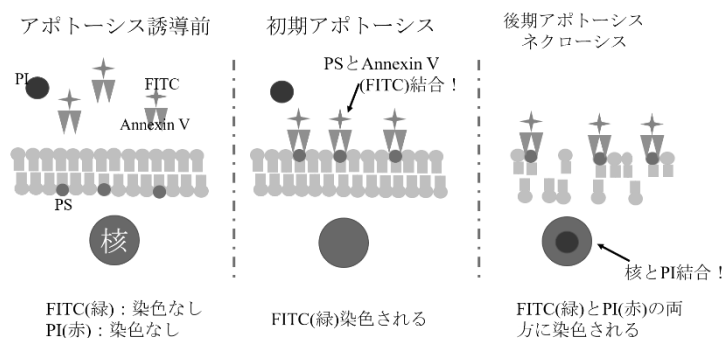
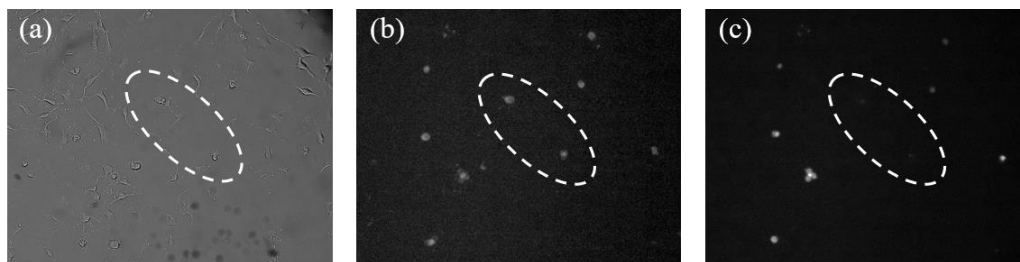


図 8 : Annexin V:FITC と PI による
アポトーシス検出

そこで続いての細胞死誘導で、STP 投与からのインキュベート時間を 30 分に縮め蛍光観察を行った(図 9)。染色された細胞の数は 1.5 時間インキュベートしたときよりも少なく、FITC のみに染色された細胞も観察され、初期アポトーシスを確認した。以上から、二種の蛍光標識 FITC、PI を用いることで、HeLa 細胞の初期アポトーシスと後期アポトーシスの識別ができることが確認できた。また、細胞死過程にある細胞は時間が経つにつれ増加し、初期アポトーシスを確認できるのは、STP 投与よ

り 30 分程度であることが検討できた。

観察例 1



観察例 2

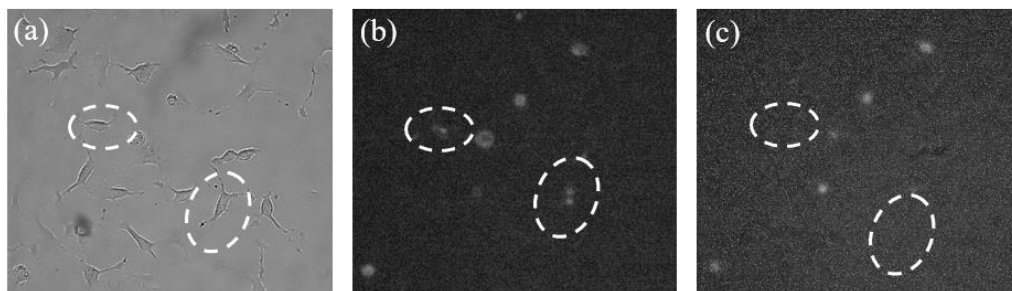


図 9 : Hela 細胞死誘導(STP 処理より 30 分)の蛍光顕微鏡観察(2) (a)明視野像 (b)FITC 蛍光像 (c)PI 蛍光像。同箇所細胞の観察。(観察時の溶液は図 7 と同上)

【3】 ステージ上での蛍光観察

極小なステージ上で蛍光顕微鏡により死細胞を検出するための前段階として、ステージ上で蛍光観察が可能か検証した。ステージ上の培養細胞を蛍光標識 CellMask Green で染色し、蛍光顕微鏡で観察した(図 10)。励起光のステージを通過するためにステージ淵に散乱光が見えるが、細胞が蛍光し、輪郭が明瞭にわかる。ステージ上でも十分に蛍光観察ができた。

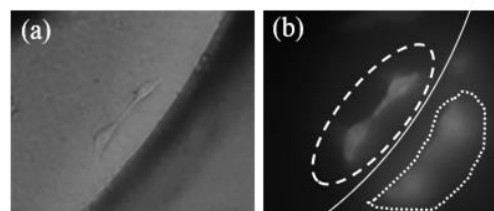


図 10 : ステージ上培養細胞の蛍光観察(a)明視野像 (b)蛍光像 (実線:ステージ淵破線:細胞 点線:散乱光)

【4】 ステージ上での細胞死誘導

極小のステージ上で細胞死誘導が可能か検証するために、ステージ上に直接培養した細胞に STP(終濃度 1 μM)を投与し、死細胞の蛍光検出を行った (図 11)。ステージで蛍光観察を行う際、励起光が蛍光標識に照射されるまでステージ内を通過するために散乱され、バックグラウンド光が強くなったが、FITC と PI による細胞の蛍光が認められた。図 11 中の矢印で示された細胞は FITC のみ、白丸で囲われた細胞は FITC と PI の両方に染色されており、前者は初期アポトーシス、後者は後期アポトーシス・ネクローシスにあるとわかる。ステージ上において細胞死を誘導し、かつ初期アポトーシスと後期アポトーシスを識別することに成功した。

【5】 蛍光顕微鏡を用いたカンチレバーの細胞へのアプローチ

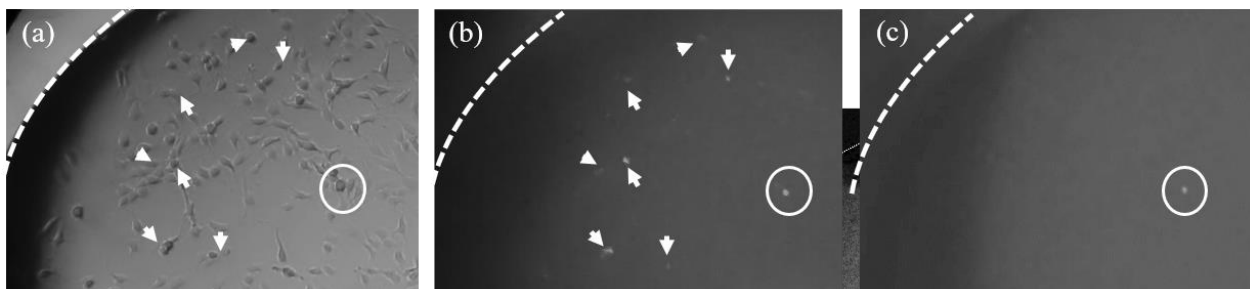


図 11：ステージ上での細胞死誘導 (a)明視野像 (b)FITC 蛍光像 (c)PI 蛍光像。破線はステージの淵である。(観察時の溶液：4 mL DMEM)

高速 AFM の装置に組み合わせた蛍光顕微鏡を用いて、ステージ上に培養した Hela 細胞を観察した。この実験では、CellMask Green により細胞を蛍光染色したのち、ステージを高速 AFM 装置に移し、蛍光観察を行った。その後、図 12：高速 AFM 装置におけるステージ上細胞の蛍光観察。破線はカンチレバー、点線はステージの淵である。 蛍光している細胞に対しカンチレバーをアプローチした(図 12)。【3】までで使用していた蛍光顕微鏡では励起光がステージを通して細胞に照射されるのに対し、高速 AFM の装置では構造上、励起光が直接ステージに当たるので、散乱光が生じず、細胞の蛍光が鮮明に観測できる。FITC と PI 染色された死細胞も、この装置で蛍光観察しながらカンチレバーをアプローチし、さらには高速 AFM で観測できることが期待される。

・研究成果

本研究では、自発的細胞死の過程において細胞表面に現れる MLKL イオンチャネルのナノスケールイメージングを目指して、始めに自発的細胞死のなかでもアポトーシスの高速 AFM 測定に焦点を合てた。死細胞の高速 AFM 測定に向け、複数の検証と条件検討を行った。具体的には、STP により Hela 細胞を細胞死状態に誘導し、FITC と PI を用いて蛍光顕微鏡下で死細胞を検出した。さらには、面積の極めて小さい AFM ガラスステージ上にて細胞を培養し、かつ細胞死を誘導・検出することに成功した。また、蛍光顕微鏡の組み合わさった高速 AFM 装置にて、蛍光染色した細胞を観察しつつカンチレバーをアプローチさせることができた。今後、本研究の以上の結果を活用して、実際にアポトーシス死細胞の高速 AFM 測定に挑戦する。

・学会発表

本研究について、以下の通りポスター発表を行った。

1. 辻明宏、山下隼人、阿部真之「高速原子間力顕微鏡による細胞死過程観察のための脂質膜計測」、ポスター番号 55、リステル浜名湖、新学術領域研究『機能コアの材料科学』第 1 回若手の会 (2019/9/24-25 開催)
2. 辻明宏、山下隼人、阿部真之「高速原子間力顕微鏡による細胞死過程観察に向けた 1 細胞計測基盤の構築」、ポスター番号 P-22、大阪大学豊中キャンパス シグマホール、応用物理学会関西支部第 2 回講演会(2019/11/8 開催)

・参考文献

- [1] B. Xia, *et al.* MLKL forms cation channels. *Cell Research-Nature* (2016)
- [2] T. Uchihashi, *et al.* High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F₁-ATPase. *Science* (2011)